Outils du génie génétique:

- Rôle: manipulation d'un gène

I) Les outils

1- Enzymes de restriction:

- Rôle: couper l'ADN

endo
3'ATCG TA5'
5'TAGC AT3'
exo

a) Endonucléases:

Reconnaissent: un site de restriction de nature Palindromique.

5'ATGCGCAT3'
3'TACGCGTA5'

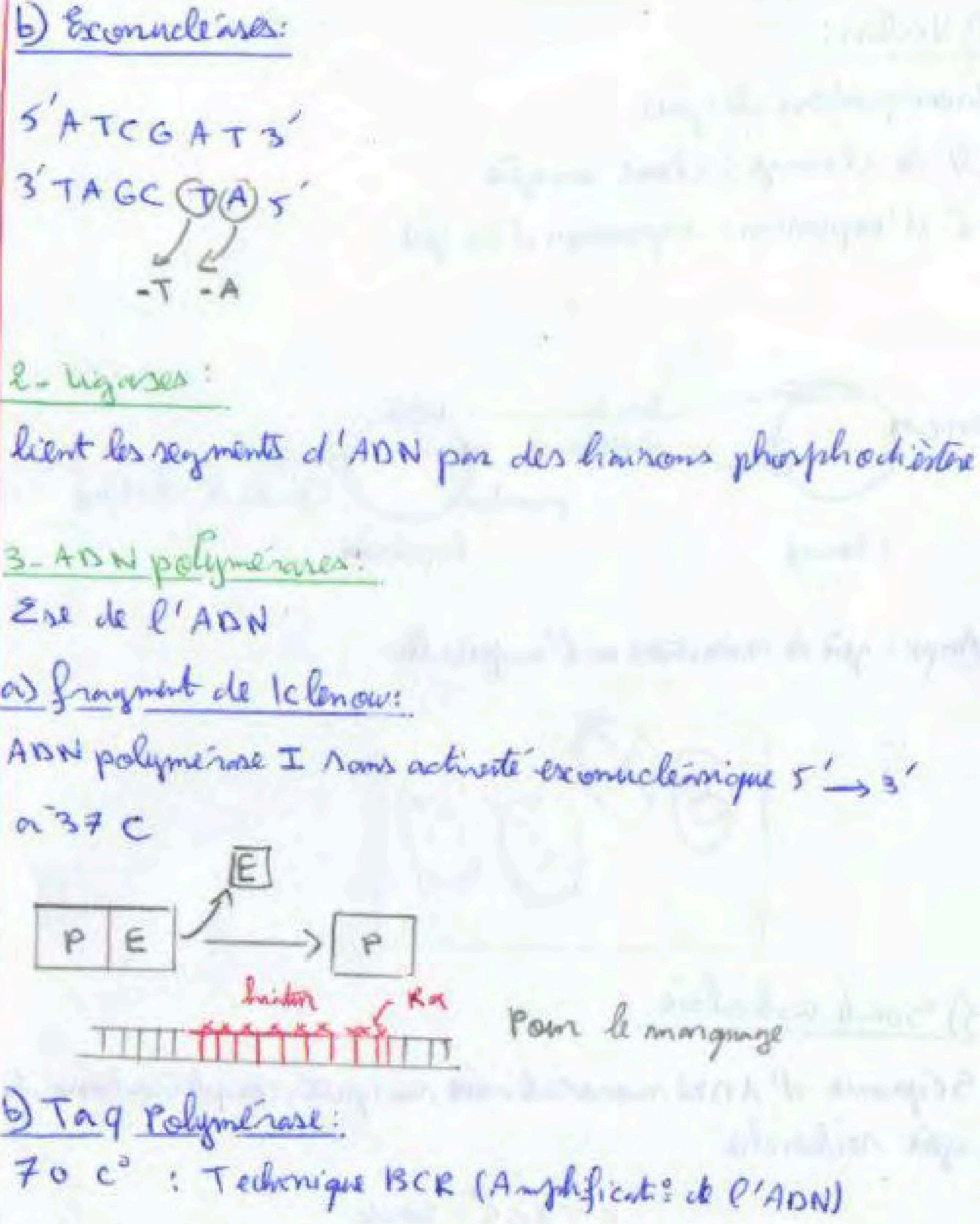
↓

5'AT3' 5'GCGCAT3'
3'TACGCG5' TA5'

Extrémités cohésives

ATGC GCAT → 5'ATGC3' 5'GCAT
ATCG CGTA → 3'TACG5' 3'CGTA

extrémités Franches



b) Exonucléases:

5'ATCGAT3'
3'TAGCTA5'

-T -A

2- Ligases:

lient les segments d'ADN par des liaisons phosphodiester

3- ADN polymérases:

Σse de l'ADN

a) fragment de Klenow:

ADN polymérase I sans activité exonucléasique 5'→3'

à 37 C

Pour le marquage

b) Taq Polymérase:

70 C° : Technique PCR (Amplificat° de l'ADN)

4) Vecteur :

Transporteurs de gènes.

- $\vec{V}$ de clonage : clone un gène
- $\vec{V}$ d'expression : expression d'un gène

Ori — Site de restriction — Ampr — promoteur — Ampr (Système de sélection)

Clonage — Expression

Ampr : gène de restriction à l'Ampicilline



5) Sonde moléculaire

Séquence d'ADN monocaténaire marquée, complémentaire du gène recherché

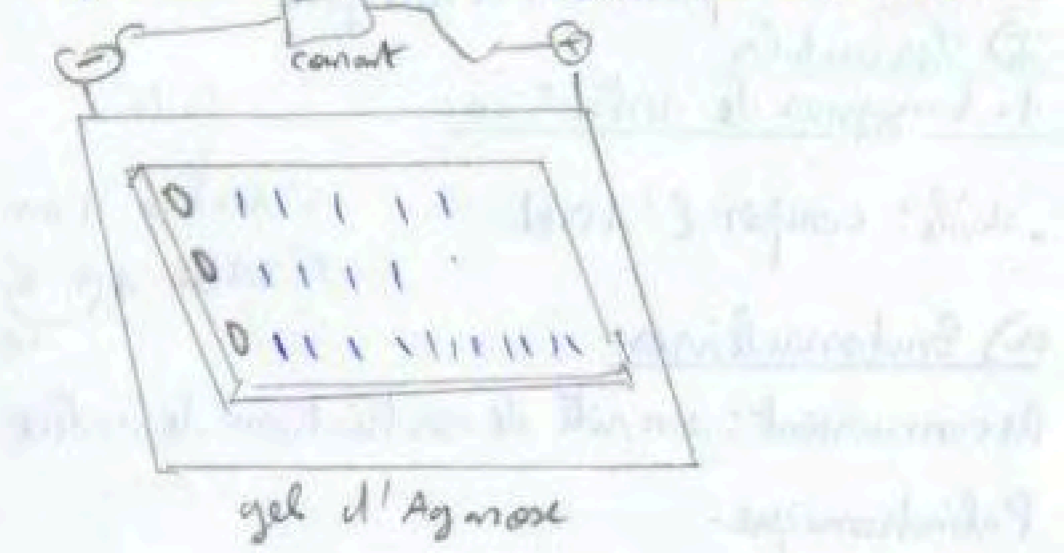
CTAGC* : Sonde

3'ATCCGATCGAAC5'

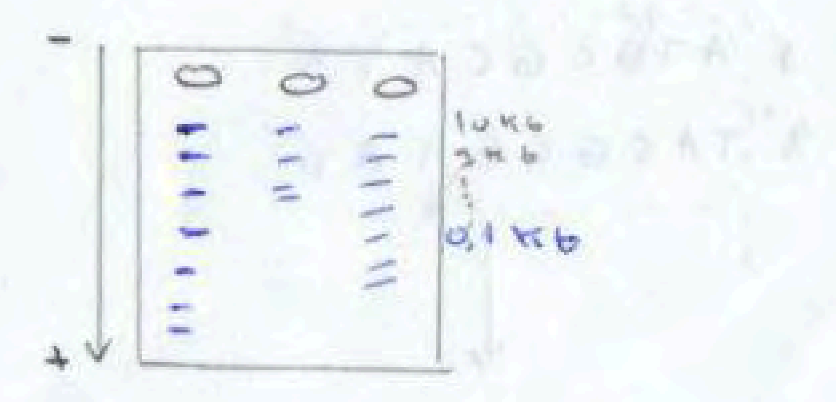


6) Technique d'électrophorèse :

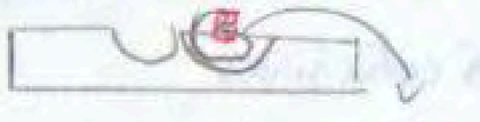
But : séparation de l'ADN en fonction du PM

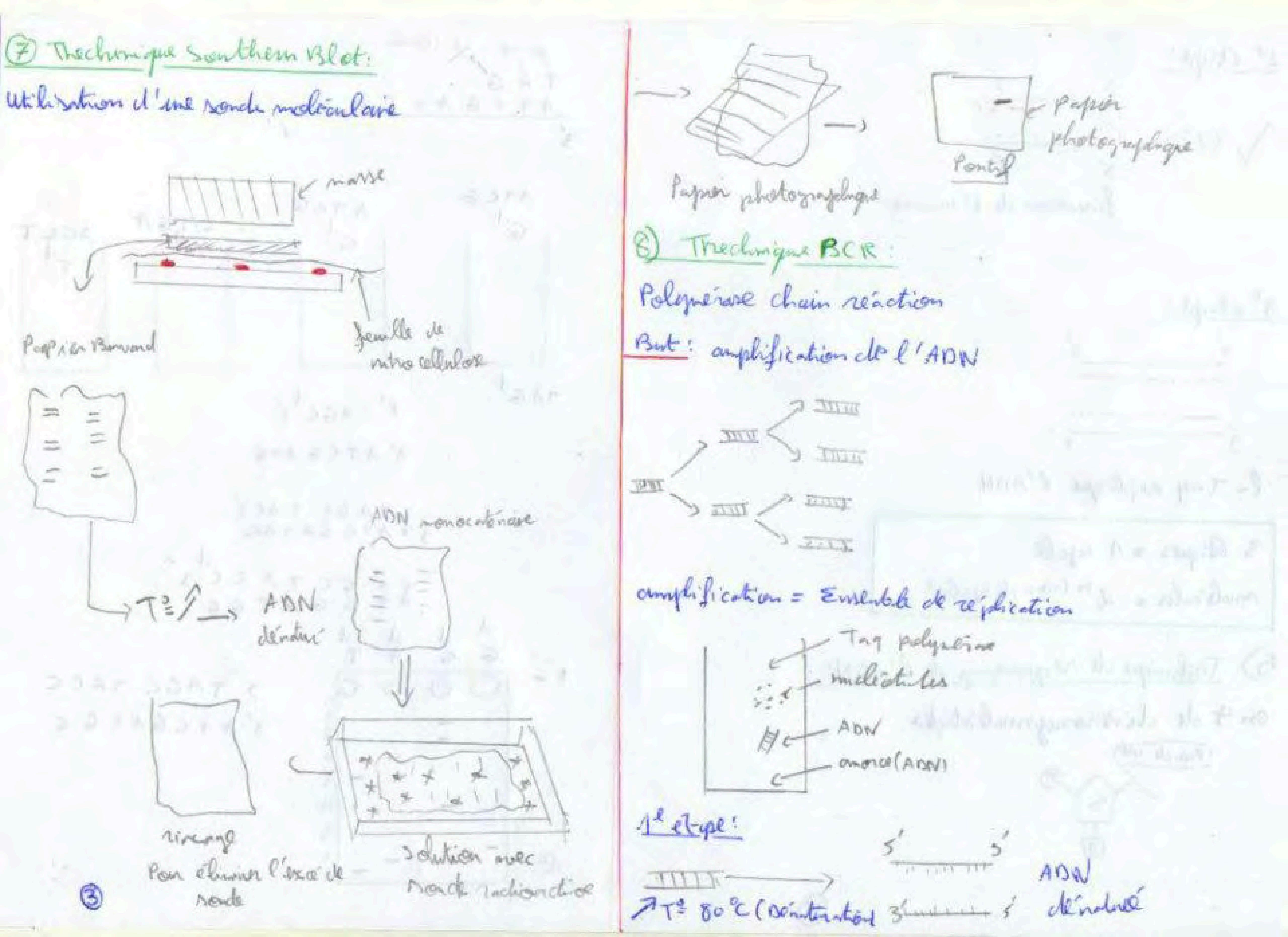


gel d'Agarose



Bromure d'éthidium : coloration de l'ADN





⑦ Technique Southern Blot:
Utilisation d'une sonde moléculaire
masse
Papier Buvard
feuille de nitrocellulose
T° ↗ → ADN dénaturé
ADN monocaténaire
rinçage
Pour éliminer l'excès de sonde
Solution avec sonde radioactive
③
Papier photographique
Papier photographique
Positif
⑧ Technique PCR:
Polymerase chain réaction
But: amplification de l'ADN
amplification = Ensemble de réplication
Taq polymérase
nucléotides
ADN
amorce (ADN)
1ère étape:
5' 5'
↗ T° 80°C (Dénaturation) 3' 5'
ADN dénaturé

2e étape :

5' 3'
5'
↘ 37°C
5'
3' 5'

fixation de l'amorce

3e étape :

5' 3'
3' 5'

la Taq réplique l'ADN

3 étapes = 1 cycle
molécules = 2^n (nbre de cycles)

5) Technique de séquençage de l'ADN :

en 4 de didésoxynucléotides

(Pas de OH)

S
P
B

OH OH
T A G — X P–C
A T C G A T C C
3' 5'

ATCG — G^d
ATCG — C^d
CTGA — A^d
AGCT — T^d

TAG^d

5' $TAGC^d$ 3'
3' ATCGATG

5' TAGC TAC 3'
3' ATC GATGC

TA GCTACC^d 3'
ATCGATGG

G^d C^d A^d T^d
5' –
5' +
9 8 7 6 5 4 3 2 1

5' TAGC TACC
3' ATCGATGG